

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Rooseveltov trg 6
10000 Zagreb
Hrvatska



**UPOTREBA BAKTERIOFAGA U LIJEČENJU
ANTIBIOTICIMA
/
USAGE OF BACTERIOPHAGES AS AN ADJUVANTS
IN ANTIBIOTIC THERAPY**

Autor: Iva Johović
Preddiplomski studij biologije
Mentor: Doc. Ivana Ivančević Bašić

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. POVIJEST LJEČENJA BAKTERIOFAGIMA.....	3
2. UVOD.....	4
3. OTPORNOST NA ANTIBIOTIKE – NOŠA NA MORA SVJETSKOG ZDRAVSTVA.....	5
4. KOMBINIRANI LJEKOVI KAO NOVI LJEKOVI.....	6
5. MEHANIZAM RADA KOMBINIRANIH LJEKOVA	
5. 1. Ciljanje na gene koji induciraju SOS odgovor.....	6
5. 2. Ciljanje drugih skupina gena.....	9
6. ZAKLJUČAK.....	12
7. LITERATURA.....	12
8. SAŽETAK.....	13
9. SUMMARY.....	14

1. POVIJEST LIJEČENJA BAKTERIOFAGIMA

Nakon što su Frederick Twort i Felix d'Hérelle 1915. i 1917. otkrili bakteriofage (fage), ta terapija je odmah prepoznata od strane mnogih kao ključ za napredak u iskorjenjivanju bakterijskih infekcija. George Eliava otputovao je u Institut Pasteur u Parizu gdje se sastao sa d'Hérelle-om, 1926. osnovao je Eliava institut u Tbilisiju, Gruzija, posvećen razvoju terapije fagima. U susjednim zemljama, uključujući i Rusiju isto je započeo razvoj opsežnih istraživanja na ovom području. U SAD-u tijekom 1940-ih, komercijalizaciju terapije fagima preuzela je velika farmaceutska tvrtka Eli Lilly. Nakon što se akumuliralo dovoljno znanja o biologiji faga i kada su napokon primjenjeni kokteli faga, rezultati koji su dobiveni bili su vrlo nepouzdana.

Otkriće antibiotika u 1941. i njihovom upotrebom u SAD-u i Europi, zapadni znanstvenici uglavnom su izgubili interes za daljnje korištenje i studije terapije fagima neko vrijeme. Rusija koja je bila izolirana od zapada 1940-ih, nastavila je razvijati već uspješnu terapiju fagima za liječenje rana vojnika na polju i u bolnicama. Tijekom Drugog svjetskog rata, Sovjetski Savez koristio je fage za liječenje mnogih vojnika zaraženih s različitim bakterijskim bolestima, npr. dizenterija i gangrena. Uspješnost terapije bila je jednako dobra ako ne i bolja nego bilo koji antibiotik. Ruski znanstvenici nastavili su i dalje razvijati i usavršavati svoje tretmane i objavljivati svoje rezultate istraživanja.

Međutim, s obzirom na znanstvene prepreke Hladnog rata, njihovi radovi nisu bili prevedeni i nova saznanja nisu se proširila širom svijeta. Na Eliava institutu u Tbilisiju nalazi se opsežna biblioteka koja pokriva sve radove i dopise tih znanstvenika. Terapija fagima danas je rasprostranjen oblik liječenja u toj regiji. Osamdeset godina gruzijski liječnici primjenjuju terapiju fagima u liječenju svojih ljudi, uključujući i bebe i novorođenčad. Zbog razvoja rezistencije na antibiotike od 1950-ih i unaprijeđenja znanstvenih spoznaja, došlo je do ponovnog interesa širom svijeta za primjenu terapije fagima u liječenju bakterijskih infekcija i kroničnih polimikrobioloških biofilmova.

Fagi su proučavani kao sredstvo za uklanjanje potencijalnih patogena kao što je *Campylobacter* u sirovoj hrani, te *Listeria* u svježoj hrani ili za smanjenje bakterija kvarenja hrane. U poljoprivredi fagi su se koristili za borbu protiv patogena kao što je *Campylobacter*, *Escherichia* i *Salmonella* pri uzgoju domaćih životinja, *Lactococcus* i *Vibrio* patogena u ribi iz akvakulture i *Erwinia* i *Xanthomonas* u biljkama poljoprivredne važnosti. Međutim, najduže se fagi ipak upotrebljavaju u humanoj medicini. Fagi se koriste protiv dijareje uzrokovane bakterijama *E. coli*, *Shigella* ili *Vibrio*, te protiv infekcija rana uzrokovanih

fakultativnim patogenom kože kao što su stafilokoki i streptokoki. " Preuzeto i prilagođeno iz http://en.wikipedia.org/wiki/Phage_therapy "

Nedavno je terapija fagima korištena u liječenju sustavne intracelularne infekcije. Osim repliciraju ih faga, mogu se koristiti ne-repliciraju i fagi ili izolirani enzimi iz faga poput lizina. Međutim, stvarni dokaz za učinkovitost terapije fagima u bolnicama nije dostupan. Također, fagi se mogu koristiti i u kombinaciji s tradicionalnim antibioticima što predstavlja još jednu mogućnost upotrebe faga u liječenju. Osim toga, postoje podaci o upotrebi faga za ispoljavanje antitumorskih agenasa u *in vitro* pokusima na stanicama u kulturi.

2. UVOD

Razvoj antimikrobnih lijekova značajno zaostaje za širenjem otpornosti bakterija na antibiotike što za rezultat stvara potrebu za novim antibakterijskim terapijama koje se mogu brzo osmisлити i primijeniti. Koristeći saznanja iz genetike znanstvenici pokušavaju razviti novu vrstu terapije fagima. U sintetskoj biologiji pokušava se prekomjerno eksprimirati određene proteine faga koji će napasti bakterijske skupine gena na koje antibiotici ne djeluju izravno i na taj način stvoriti podlogu za djelotvornije liječenje antibioticima. Genetski promijenjeni bakteriofag može povećati smrtnost bakterije otporne na antibiotike. Također fagi mogu smanjiti broj otpornih bakterija koje potječu od tretirane populacije te tako djelovati kao dobra podloga za liječenje drugim antibioticima. Na primjer inhibicijom SOS gena u bakteriji *E. coli* pomoću mutiranog bakteriofaga može se povećati djelovanje kvinolona o čemu će biti više dalje u tekstu. Osim toga, fagi se mogu prekomjerno eksprimirati određene druge gene i proizvode kao učinkovite dodatke antibiotiku.

3. OTPORNOST NA ANTIBIOTIKE - NO NA MORA SVJETSKOG ZDRAVSTVA

Već 60-ak godina antibiotici se upotrebljavaju za liječenje gotovo svih poznatih infekcija. Zajedno s povećanjem upotrebe antibiotika raste i razvoj otpornosti na njih. Bakterijske infekcije odgovorne su za značajnu smrtnost u klinici. Svake godine više od 5 milijuna ljudi umire u bolnicama diljem svijeta zbog neuspjelog tretmana infekcije antibiotikom. Mnoge infekcije koje su se u prošlosti lako liječile putem antibiotika sada su stekle otpornost što rezultira bolesnijim pacijentima i dužim hospitalizacijama.

Bakterije otpornost na antibiotik mogu steći i na nekoliko načina: a) malim promjenama u genomu, takozvanim točkastim mutacijama, odnosno promjenama na jednom paru baza u DNA; b) velikim promjenama u genomu, odnosno preinakama velikih dijelova genoma, najčešće umetanjem ili gubitkom transpozona ili insercijskih slijedova kao jednim događajem; c) te napokon unosom strane DNA (procesima konjugacije, transformacije, transdukcije ili transpozicije). Prva dva mehanizma ograničena su na jednu bakterijsku stanicu. Nakon što gen za otpornost nastane, može se širiti vertikalno diobom bakterija ili horizontalno od jedne bakterije na drugu, prijenosom strane DNA. Takvo horizontalno širenje nije ograničeno samo na bakterije istoga roda, već je širenje moguće i između bakterija sasvim različitih rodova.

Rezistencija bakterija na antibiotike važna je evolucijska prednost za bakteriju, te se tako dalje u prirodi šire otporni klonovi. Danas su stafilokoki jedna od najubjedljivijih vrsta bakterije. činjenica da su odavno "porazili" većinu poznatih antibiotika, među njima i penicilin i amoksisilin, više je nego zabrinjavajuća. Za liječenje se danas koristi samo vankomicin iako su pronađeni slučajevi otpornosti i na taj antibiotik. Stafilokok nije jedini zabrinjavajući primjer. Enterokoki, pseudomonas i acinetobakter također su otporne na većinu antibiotika u primjeni. Ukoliko se te apsolutno nepobjedive bakterije rašire po bolnicama diljem svijeta to bi značilo da bi boravak u bolnicama zbog najjednostavnijih zahvata mogao biti koban.

Rast otpornosti veliki je izazov za suvremenu medicinu. Ekonomski utjecaj infekcija otpornih na antibiotike u SAD-u procjenjuje se na između 5 i 24 milijardi dolara godišnje. Potrebne su nove vrste antibiotika i u inkubitivnih antimikrobnih agenasa, no ipak se samo nekoliko njih nalazi u proizvodnji. Tehnike visoke propusnosti u kombinaciji s tradicionalnim tehnikama molekularne biologije omogućile su otkrivanje potencijalnih meta lijekova za nove antibiotike. Međutim, proces od identifikacije meta do stvarnih komponenata lijeka zahtijeva značajni ulog dodatnog rada i investicije. Štoviše, tipično je za antibiotike da se za njih ne koriste metode koji se moraju prilagoditi za postizanje antimikrobne aktivnosti.

Kao rezultat toga ostaje značajna praznina između pronalazača meta i razvoja lijeka. Injenica da u zadnjih trideset godina nije otkriven niti jedan novi antibiotik ne daje nam neku nadu u situaciji u kojoj se nalazimo. Jedino je sigurno da se moraju razviti nove metode ubijanja infekcija.

4. KOMBINIRANI LIJEKOVI KAO NOVI LIJEKOVI

Alternativa antibioticima je terapija fagima koja se za ubijanje bakterija koristi još od početka 20. stoljeća. Fag može lizirati bakterije odnosno može se modificirati da ispolji smrtonosne gene koji će prouzrokovati smrt stanice. Međutim, fagi koji su direktno smrtonosni za svoje bakterije domaćine mogu u kratko vrijeme dovesti do razvoja otpornosti bakterija na fag. Kako bi se smanjio razvoj otpornosti na fage stručnjaci su nastojali razviti mutirani fag koji će izazvati minimalni evolucijski otpor. U tu svrhu su fagi mutirani da ekspresiraju proteine koji reguliraju skupine gena na koje antibiotici ne djeluju izravno. Korištenjem kombinacije mutiranog faga koji pojačava djelovanje antibiotika i samog antibiotika postiže se smanjenje otpornosti na antibiotik i pojačanje smrtnosti bakterije.

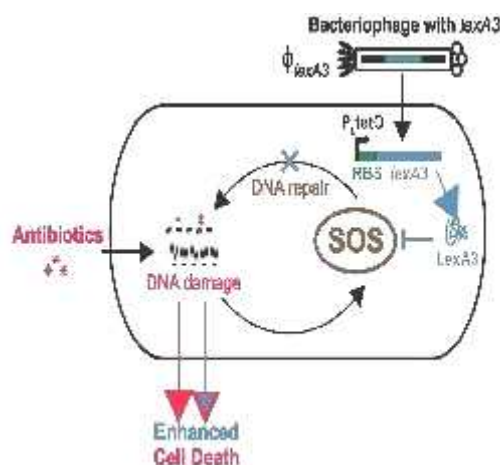
5. MEHANIZAM RADA KOMBINIRANIH LIJEKOVA

5. 1. Ciljanje na gene koji induciraju SOS odgovor

Poznato je da se u bakteriji s oštećenjem DNA aktivira SOS odgovor kojim se prepisuju geni uključeni u popravak DNA. SOS odgovor je važan mehanizam u održavanju integriteta genoma bakterije *Escherichia coli*. Indukciju SOS odgovora reguliraju protein LexA koji djeluje kao represor i aktivator - protein RecA koji katalizira samocijepanje represora LexA.

Najnoviji podaci ukazuju da je ubijanje bakterija antibioticima efikasnije kada imaju mutiran gen *recA* koji je ujedno regulator SOS odgovora (Lu i sur. 2009). Za inaktivaciju SOS odgovora znanstvenici su koristili fag M13mp18. Fag M13mp18 je modificirana verzija faga M13 i korišten je kao model jer se radi o nelitičkom filamentoznom fagu koji može podnijeti unos DNA u svoj genom. U fagu M13mp18 prekomjerno se eksprimira mutirani represor LexA3, koji se ne može pocijepati, pa se SOS odgovor ne može inducirati. Osim

toga, gen *lexA3* je stavljen pod kontrolu promotora P_{LtetO} . Dobiveni fag su nazvali ϕ_{lexA3} a nemodificiranu veziju M13mp18 faga zovemo ϕ_{unmod} . Promotor P_{LtetO} , koji je inhibiran u prisustvu represora *TetR*, konstitutivno je aktiviran u stanicama EMGR u kojima nedostaje *TetR*. Fag ϕ_{lexA3} inhibirao je indukciju SOS odgovora u stanicama tretiranim ofloxacinom. To je dokazano pre enjem fluorescencije proteina zelene fluorescncije GFP (od engl. gene fluorescent protein) u stanicama EMG2 bakterije *E. coli* K-12 u kojem je gen za protein GFP pod regulacijom SOS promotora. (Sl. 1.)



Sl. 1. Shema kombinirane terapije mutiranim fagom ϕ_{lexA3} i antibiotikom u stanici *E.coli* EMG2

Izvor: Lu i sur. 2009

U inak poboljšanja djelovanja antibiotika s fagom ϕ_{lexA3} pokazan je tako što je izra unat vremenski period potreban za uništenje soja EMG2 tretiranog fagom i/ili ofloxacinom. Potom je izra unat broj vijabilnih stanica tijekom tretiranja s nemodificiranim fagom ili s fagom bez ofloxacina ili samo s ofloxacinom. Najbolji rezultati dobiveni su upotrebom faga ϕ_{lexA3} s ofloxacinom, no i nemodificirani fag tako er je poboljšao baktericidni u inak ofloxacina. To otkri e u skladu je sa prethodnim promatranjima gdje nemodificirani filamentozni fag pove ava u inkovitost antibiotika protiv *Pseudomonas almaginosa* (Lu i sur. 2009). I ϕ_{unmod} i ϕ_{lexA3} zna ajno su se replicirali tijekom eksperimenta.

Kako bi testirali da li fag ϕ_{lexA3} može djelovati kao dodatak antibiotiku u razli itim omjerima, ispitali su uništenje bakterije primjenom razli itih doza faga pri inokulaciji, odnosno putem razli itih doza ofloxacina. Za koncentracije ofloxacina od 30 ng/ml i više, fag ϕ_{lexA3} rezultirao je znatno ve im uništenjem za razliku od nemodificiranog faga ϕ_{unmod} (Lu i sur. 2009). Odatle slijedi zaklju ak da je fag ϕ_{lexA3} jak dodatak ofloxacinu pri dozama ispod i iznad minimalne inhibitorne koncentracije.

Također je istraženo može li mutirani fag povećati efikasnost antibiotika koje nisu kvinoloni. Proven je u inak poboljšanja antibiotika kod faga *lexA3* za gentamicin (aminoglikozid) i ampicilin (β-laktamski antibiotik). Fag *lexA3* povećao je efikasnost gentamicina, a također je poboljšao baktericidni učinak ampicilina (Lu i sur. 2009). Ovi rezultati u skladu su s prethodnim pokusima da su mutanti *recA* osjetljiviji na kvinolone, aminoglikozide, β-laktame, te pokazuju da mutirani fag, poput faga *lexA3*, može djelovati kao opći dodatak za sve tri glavne vrste baktericidnih lijekova.

Osim toga, ustanovljeno je da je mutirani fag *lexA3* u stanju smanjiti broj otpornih stanica u populacijama koje su već bile izložene antibioticima, a može i poboljšati učinkovitost antibiotika protiv bakterija koje žive u biofilmovima. Osim što mutirani fag pokazuje veću učinkovitost u ubijanju bakterija divljeg tipa, takav fag može poboljšati uništenje bakterija koje su već stekle otpornost na antibiotike. Razni su pokusi s bakterijama *E. coli* RFS289 koje nose mutaciju *gwrAIII* koja ih čini otpornim na antibiotik kvinolon i na njima su primijenili fage *lexA3* s ofloxacinom. Fag *lexA3* ponovno je povećao baktericidno djelovanje ofloxacina (Lu i sur. 2009). Ovi rezultati su pokazali da se fag koji poboljšava djelovanje antibiotika može iskoristiti u savladavanju otpornih bakterija u klinici koj upotrebi.

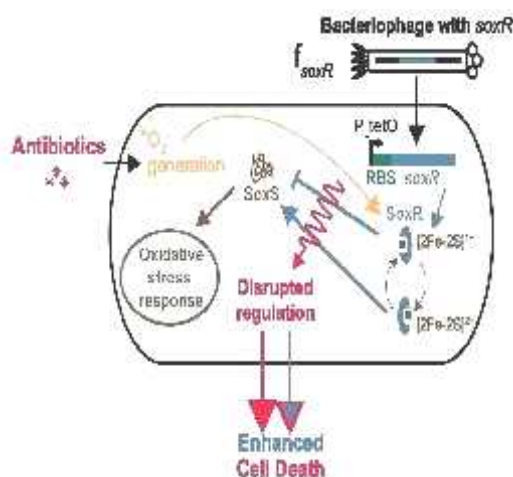
Klinička važnost ovog faga istražena je na miševima zaraženima bakterijama. U miševima je ubrizgana *E. coli* EMG2 a potom je jedna grupa miševa tretirana s fagom *lexA3* i ofloxacinom, a druga sa fagom *unmod* i ofloxacinom i treća samo sa ofloxacinom. Preživjelo je 80% miševa koji su primili fag *lexA3* s ofloxacinom za razliku od 50% miševa koji su primili fag *unmod* s ofloxacinom i 20% koji su dobili samo ofloxacin (Lu i sur. 2009). U učinkovitost ovog faga u spašavanju zaraženih miševa od smrti pokazala je da se ovaj izum može koristiti u klinici koj upotrebi.

Izloženost subinhibitornim koncentracijama antibiotika prvo dovodi do početnih mutacija koje kasnije dovode do više mutacija koje stvaraju visok nivo otpornosti. Fagi kao dodatak antibiotiku mogu dramatično reducirati broj mutanata otpornih na antibiotike.

5. 2. Ciljanje drugih skupina gena

Fage najbolje možemo iskoristiti za ciljanje mnogih različitih skupina gena kako bi se proizveli što učinkovitiji dodaci antibioticima. Na primjer, mete mogu biti proteini uključeni u stanični odgovor na superoksid (SoxR i CsrA) ili se može modulirati osjetljivost na antibiotike (npr. OmpF). Regulator SoxRS kontrolira koordiniranu staničnu reakciju na superoksid. SoxR sadržava skupinu 2Fe-2S koja se mora oksidirati da se stimulira

produkcija SoxS koja zatim kontrolira prepisivanje gena koji reagiraju na oksidativni stres. Budući da kvinoloni pokreću oksidativni napad s bazom superoksida, pretpostavilo se da mutirani fag koji nosi *SoxR* (*soxR*) divljeg tipa može utjecati na ovu reakciju te poboljšati baktericidnu aktivnost ofloxacina. Pretpostavka se pokazala točnom - *soxR* poboljšao je uništenje putem ofloxacina za razliku od nemodificiranog faga (Lu i sur. 2009; Slika 2.)

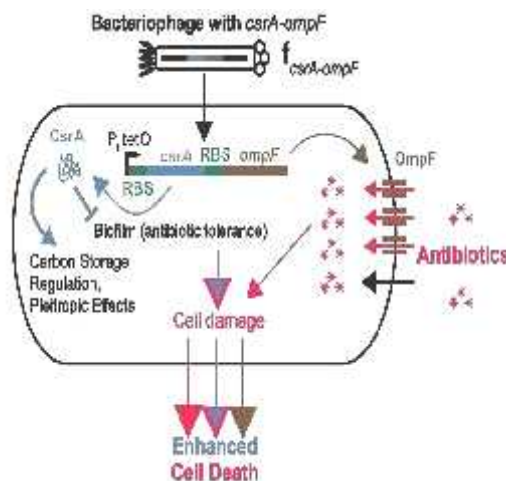


Slika 2. Shema kombinirane terapije mutiranim fagom *soxR* i ofloxacinom u stanici

Izvor: Lu i sur. 2009

Protein CsrA je globalni regulator sinteze i katalize glikogena, glukoneogeneze i glikolize, a također potiskuje i stvaranje biofilma. Pošto je stvaranje biofilma povezano sa otpornošću na antibiotike, pretpostavilo se da će fag koji prekomjerno eksprimira CsrA (*csrA*) povećati osjetljivost na tretiranje antibioticima. Osim toga, budući da je OmpF porin kojeg koriste kvinoloni da uđu u bakteriju, pretpostavilo se da će fag *ompF* koji prekomjerno eksprimira OmpF povećati uništenje uz pomoć ofloxacina. Obje pretpostavke pokazale su se točnim i fag *csrA* i fag *ompF* povećali su baktericidni učinak ofloxacina.

Osim toga na injen je višeciljni fag M13mp18 koji može istodobno prekomjerno ekspimirati i CsrA i OmpF (*csrA-ompF*) čime se napada genske mreže pod kontrolom CsrA i povećava prodornost lijeka. Fag *csrA-ompF* je u inkubitiji u poboljšanju baktericidnog učinka ofloxacina u okruženju planktona i biofilma (Lu i sur. 2009; Slika 3).



Sl. 3. Shema kombinirane terapije mutiranim fagom *csrA-ompF* i ofloxacinom u biofilmu u kojem se javila otpornost na antibiotik

Izvor: Lu i sur. 2009.

Zajedni ki, ovi rezultati pokazuju da manipulirani fag, koji ne cilja na gene SOS odgovora i/ili prekomjerno eksprimira višestruke proteine, može biti u inkoviti dodatak antibiotiku.

6. ZAKLJUČAK

Kombinirana terapija antibiotika i bakteriofaga kojim se poboljšava u inak antibiotika ima mogućnost za antimikrobnu strategiju koja obećava i ima kliničku relevantnost. Fagi se mogu promijeniti na mnogo načina tako da budu učinkoviti kao dodatak antibioticima *in vitro* i *in vivo* te oni tako mogu pomoći u premoštenju jaza između pronalaska i upotrebe antimikrobne metode. Unatoč potencijalnim koristima koje smo ranije opisali u tekstu, fag tek treba prihvatiti u kliničkoj praksi zbog brojnih pitanja, poput imunogeneze faga, u učinkovitosti, identifikacije ciljane bakterije i selekcije faga, specifičnosti domaćina i ispuštanju otrova. Kako bi smanjili rizik od zaostanka lizogenih čestica u pacijentima nakon tretmana, fag bi se mogao modificirati u nereplikativan oblik.

Uz najmoderniju tehnologiju sekvenciranja i sinteze DNA jedan cjelovito inženjirani genom bakteriofaga, koji nosi višestruke gene protiv različitih genskih sustava, mogao bi se u budućnosti sintetizirati za manje od 10000 \$. Ove bi tehnologije trebale omogućiti stvaranje klase faga koji poboljšavaju antibiotike, a može se primijeniti s različitim antibioticima protiv širokog raspona bakterijskih infekcija. Ciljanje kliničkih bakterijskih linija s klasama inženjiranih faga bit će ključan korak u primjeni ove strategije protiv stvarnih infekcija.

Modificirani fagi mogli bi uskoro naći svoju primjenu u industriji, poljoprivredi i obradi hrane gdje su prisutni bakterijski filmovi i druge bakterije kojih se teško riješiti. Primjena mutiranog faga kao dodatka antibiotiku u privredi mogla bi biti od ekonomske prednosti i smanjiti otpornost na antibiotik koja je stečena u okolišu, te biti mudar korak naprijed prema konačnoj primjeni u kliničke svrhe.

7. LITERATURA

- http://en.wikipedia.org/wiki/Phage_therapy
- <http://www.intralytix.com/history.htm>
- SMILJA KALENI , Rezistencija bakterija na antibiotike
- TIMOTHY K. LU, JAMES J. COLLINS, 2009., Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy , PNAS 106: 4629-4634.

8. SAŽETAK

Kombinirani lijekovi koji sadrže mutirane fage i antibiotike mogu a su alternativa konvencionalnim tretmanima s antibioticima protiv bakterijskih infekcija. Fag se mutira kako bi pojačano ekspimirao odabrane proteine koji reguliraju određene skupine gena, odnosno skupine gena na koje antibiotici ne djeluju izravno i time oslabe bakterijsku stanicu te tako pojačavaju uspješnost djelovanja antibiotika.

Kombinirani lijekovi ciljaju na gene koji nisu esencijalni za bakterijsku stanicu, te na gene koji uzrokuju indukciju SOS odgovora u bakterijskim stanicama. SOS odgovor u bakterijskim stanicama inhibiran je tretiranjem s mutiranim fagom *lexA3* u kojem je gen *lexA3* stavljen je pod kontrolu promotora P_{LtetO} koji uzrokuje njegovo prekomjerno ekspimiranje. Djelovanje raznih klasa antibiotika (kvinoloni, aminoglikozidi, β -laktami) značajno je poboljšano korištenjem spomenutog faga. Osim toga, dokazano je da je mutirani fag *lexA3* u stanju značajno smanjiti broj otpornih stanica u populacijama koje su već bile izložene antibioticima.

Klinička važnost faga *lexA3* vidljiva je iz njegove učinkovitosti u spašavanju zaraženih miševa. I druge skupine gena mogu se unijeti u bakteriofage, (SoxR, CsrA, OmpF) s ciljem da se poboljša baktericidna učinkovitost antibiotika i rezultati su bili veoma uspješni. Fagi su pogodni za ugradnju i više meta odjednom i tako nastaju višeciljni fagi koji ciljaju na višestruke receptore u bakterijskim stanicama i u nekim okruženjima oni pokazuju i znatno bolje rezultate od jednociljnih faga, kao npr. u biofilmovima.

9. SUMMARY

Combination therapy containing mutated phages and antibiotics is a possible alternative to conventional treatment with antibiotics only. Phages are changed to overexpress selected proteins that regulate a group of genes, or groups of genes that are not directly attacked by antibiotics. In that way, they weaken the bacterial cells, thus enhancing the improved effects of antibiotics.

Combination therapy targets nonessential genes, or genes that induce the SOS response in bacterial cells. In the experiment bacteria was treated with mutated phage ϕ_{lexA3} . In this phage, the *lexA3* gene was placed under the control of the synthetic P_{LtetO} promoter which caused overexpression of *lexA3*. ϕ_{lexA3} suppressed the SOS response induced by antibiotic (quinolones) and improved the bactericidal effect of the same antibiotic. Bactericidal effect of other class of antibiotic (amino glycosides, β -lactam antibiotics) was also considerably improved with usage of *lexA3*. They also found out that mutated phage ϕ_{lexA3} is capable of reducing the number of bacterial cells that already have acquired antibiotic resistance.

Clinical relevance of mutated phage ϕ_{lexA3} is visible from its efficacy in preventing death in mice infected with bacteria. Also other gene networks were also targeted to produce effective antibiotic adjuvants (SoxR, CsrA, OmpF) that proved efficient. Mutated bacteriophages are well suited for incorporating multiple targets. The multitarget phage in some surroundings (for example, biofilm) showed better bactericidal effect compared with single-target relatives.